

Laura Rocío Castañón-Olivares¹, Edith Sánchez-Paredes¹, Roberto Alejandro Arreguín-Espinosa²,
Guillermo Miguel Ruiz-Palacios y Santos³, Alfredo Carmona⁴, Rubén López-Martínez¹

¹Laboratorio de Micología Médica. Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina, UNAM. México, D.F.

²Departamento de Bioquímica. Instituto de Química, UNAM. México. D.F. ³Departamento de Infectología. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, SS. México, D.F. ⁴Laboratorio de Micología. Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. México, D.F.

Isolation of *Cryptococcus albidus* on eucalyptus trees

Abstract. Some *Cryptococcus* yeast species have established diverse ecological associations with plants. *Cryptococcus neoformans*, *C. gattii*, *C. laurentii*, *C. albidus*, and *C. uniguttulatus* are etiological agents of cryptococcosis, a severe mycotic infection, and of allergies in humans. The study of the natural habitat of *Cryptococcus* spp. is of medical relevance, because the habitat of these yeasts could represent a source of infection for these diseases. In this study, the presence of *Cryptococcus* spp. was investigated in *Eucalyptus* spp. trees in the National University campus, Mexico City. A total of 923 samples of leaves, flowers, and buds obtained from 135 trees during one year in four different occasions were processed in niger agar medium. The isolated fungal colonies were identified by morphological and biochemical methods. The 4179 fungal colonies obtained were identified, in order of frequency, as: *Saccharomyces* spp., *Candida* spp., *Aureobasidium* spp., *Epicoccum* spp., *Exophiala* spp., *Trichosporon* spp., *Penicillium* spp., *Alternaria* spp., and *Aspergillus* spp. The only *Cryptococcus* species isolated corresponded to *C. albidus* in seven samples.

Key words: Cryptococcosis, ecology, *Eucalyptus*.

Resumen. Algunas especies de levaduras pertenecientes al género *Cryptococcus*, han establecido diversas asociaciones ecológicas con sustratos vegetales. *Cryptococcus neoformans*, *C. gattii*, *C. laurentii*, *C. albidus* y *C. uniguttulatus*, son especies reconocidas como causantes de criptococosis, infección sistémica grave y de alergias, en el humano. El estudio del hábitat natural de *Cryptococcus* spp., cobra importancia médica, pues el ambiente de estas levaduras podría representar una fuente de infección para adquirir esas enfermedades. En este trabajo se investigó la presencia de levaduras de *Cryptococcus* spp. en árboles de *Eucalyptus* spp., ubicados en Ciudad Universitaria, México. Se muestrearon hojas, flores y yemas de 135 árboles durante un año en cuatro ocasiones diferentes, obteniendo un total de 923 muestras, las cuales fueron cultivadas en medio de níger. Las colonias de hongos aisladas, fueron identificadas morfológica y bioquímicamente. Se identificaron 4179 colonias de hongos que en orden decreciente de frecuencia fueron: *Saccharomyces* spp., *Candida* spp., *Aureobasidium* spp., *Epicoccum* spp., *Exophiala* spp., *Trichosporon* spp., *Penicillium* spp., *Alternaria* spp. y *Aspergillus* spp. La única especie de *Cryptococcus* aislada correspondió a *C. albidus* que fue identificada en siete muestras.

Palabras clave: Criptococosis, ecología, *Eucalyptus*.

Received 21 August 2007; accepted 30 November 2007.

Recibido 21 de agosto 2007; aceptado 30 de noviembre 2007.

Autor para correspondencia: Laura Rocío Castañón Olivares
lrcastao@servidor.unam.mx

Introducción

Dentro del género *Cryptococcus* se han descrito alrededor de 30 especies, las cuales se identifican por la asimilación a diferentes carbohidratos y compuestos nitrogenados [1], por la morfología de los estados teleomorfos [10, 23] y por estudios de las secuencias parciales, obtenidas a través de ARNr [8, 10]. *Cryptococcus neoformans*, *C. gattii* [3, 17] y en menor frecuencia *C. albidus* [3, 5], *C. laurentii* y *C. uniguttulatus* [3, 18, 21] son considerados como agentes etiológicos de la criptococosis humana.

C. albidus, *C. laurentii* y *C. neoformans* son levaduras muy ubicuas, aisladas de frutas, flores [4, 27], árboles de eucalipto y su ambiente circunvecino [6, 11, 23] del filoplano (superficie foliar) de algunas plantas [13], así como también del suelo [4, 22] y materia fecal de palomas [14, 20]. Por el contrario, tanto *C. uniguttulatus* como *C. gattii* son organismos con hábitats naturales limitados, el primero se ha podido aislar a partir de algunos substratos vegetales y del agua [16], mientras que el segundo se ha aislado principalmente de árboles como: *Angophora costata* y *Syncarpia glomulifera* [28], *Terminalia catapa* [2] y *Moquiela tomentosa* [15]. Sin embargo, en Australia *C. gattii* se ha aislado principalmente en diversas especies de árboles de eucalipto: *Eucalyptus camaldulensis*, *E. tereticornis*, *E. rudis*, *E. gomphocephala*, *E. blakelyi* [7], concluyendo que el eucalipto es el principal reservorio de esta especie de levadura [7, 23].

Con fines de reforestación de las áreas verdes en la ciudad de México, se introdujeron desde hace un siglo, árboles de eucalipto originarios de Australia. El campus conocido como Ciudad Universitaria perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México, alberga una gran población de árboles de eucalipto, siendo *Eucalyptus camaldulensis* la especie dominante y con menor frecuencia *E. (aff.) tereticornis*, *E. globulus* y *E. resinifera* [26]. Con

estos antecedentes y para contribuir al conocimiento epidemiológico de la criptococosis en nuestro país, este estudio tuvo como objetivo investigar la presencia de levaduras del género *Cryptococcus* en estos árboles de eucalipto.

Materiales y métodos

Mediante el método de números aleatorios, se seleccionaron 135 árboles sanos de *Eucalyptus* spp., localizados en ocho zonas de Ciudad Universitaria, todas con riego artificial variable. Durante un año y en cuatro ocasiones diferentes (enero, abril, junio y octubre) se tomaron fragmentos de hojas, flores y yemas de cada árbol, colectando un total de 923 muestras. En cada uno de los días de colecta, se registraron datos de temperaturas máxima y mínima, así como índices de precipitación pluvial.

Se tomaron 3 g de cada muestra, cada una de las cuales se trituraron en mortero, adicionando 10 ml de solución salina estéril con 200 U de penicilina, 400 mg de estreptomycin y 10 mg de cloranfenicol. De la suspensión obtenida, se hizo una dilución 1:100, de la cual se sembraron 10 ml en placas de agar níger [24]. Estas placas se incubaron en la oscuridad a 28 °C hasta dos semanas, haciéndose revisiones cada dos días.

La identificación de los hongos, se realizó por la morfología macroscópica de las colonias anotando aspecto, color, borde, textura y consistencia; la morfología microscópica se efectuó mediante el examen directo con azul de algodón y tinta china. Las colonias sugestivas de ser *Cryptococcus*, se resembraron nuevamente en el medio de níger, en el cual fueron purificadas, a partir de las cuales se realizaron las siguientes pruebas: crecimiento a 37°C, presencia de pigmentos melánicos en agar níger, producción de ureasas, desarrollo de cápsula en agar chocolate, sensibilidad a la cicloheximida, presencia de proteasas

mediante la hidrólisis de gelatina al 12.0%, producción de almidón, desarrollo de tubo germinativo, presencia de pigmentos en agar extracto de malta, producción de pseudomicelio en agar harina de maíz, fermentación de dextrosa y finalmente, asimilación de carbohidratos y algunos compuestos nitrogenados mediante VITEK® System (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France).

Resultados y discusión

Los 135 árboles estudiados, representan un muestreo estadísticamente significativo del total de los árboles de eucalipto existentes en el campus de la Ciudad Universitaria de la UNAM. Se obtuvieron 923 muestras, de las cuales se aislaron 4,179 colonias de hongos; de éstas siete fueron identificadas como *C. albidus*, mostrando las siguientes características: colonias de consistencia cremosa y color marrón claro en agar níger (Figura 1); al examen microscópico directo se observaron levaduras redondas rodeadas de cápsula de tamaño variable (Figura 2). La hidrólisis de urea y crecimiento a 37°C fueron positivos. Los

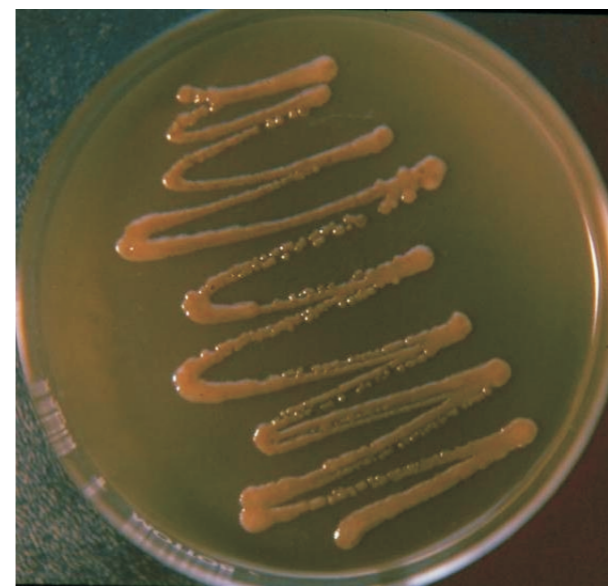


Figura 1. Colonias de *Cryptococcus albidus* en el medio de agar níger.

resultados de asimilación de carbohidratos y compuestos nitrogenados, correspondieron a *C. albidus*.

En la Tabla 1 se observa la frecuencia de aislamiento de hongos filamentosos y levaduriformes diferentes de *C. albidus*. Es evidente el dominio de las levaduras (*Candida* 13.1 % y *Trichosporon* 8.6 %), sobre los hongos filamentosos (*Penicillium* 7.7 %, *Alternaria* 5.6 %, *Aspergillus* 4.6 %); sin embargo, *C. albidus* a diferencia de otros estudios, fue hallado en una frecuencia muy baja, lo que sugiere que el crecimiento de esta especie de levadura se ve inhibido por el desarrollo de otros hongos que compiten por el mismo substrato.

De acuerdo a las condiciones ambientales, se observó que la temperatura y precipitación pluvial fueron diferentes en cada uno de los meses de estudio. De los siete aislados de *C. albidus*, tres fueron obtenidos en el mes de abril, dos en julio y dos en octubre. Durante el mes de enero no se aisló a esta especie (Tabla 2). La mayoría de los hongos filamentosos fueron aislados durante las estaciones de julio y octubre.

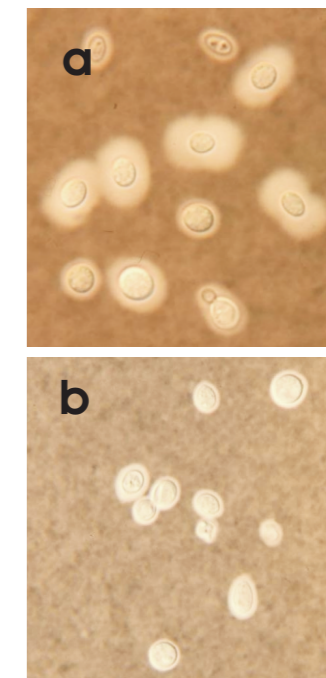


Figura 2. Microscopía de levaduras de *Cryptococcus albidus*: (a) con cápsula grande $\geq 3 \mu\text{m}$, (b) con cápsula pequeña $< 3 \mu\text{m}$. Tinción negativa de tinta china. 400 X.

Tabla 1. Frecuencia de aislamientos de diferentes géneros de hongos aislados en las 923 muestras estudiadas

Géneros	Número de colonias	%
<i>Scopulariopsis</i>	1	0.1
<i>Cryptococcus</i>	7	0.1
<i>Fusarium</i>	10	0.2
<i>Monilia</i>	15	0.4
Micelia sterilia	34	0.8
<i>Cladosporium</i>	76	1.8
<i>Zygosporium</i>	79	1.9
<i>Tricladium</i>	110	2.7
Mucorales	120	2.9
<i>Rhodotorula</i>	121	2.9
<i>Sporobolomyces</i>	191	4.6
<i>Aspergillus</i>	191	4.6
<i>Alternaria</i>	232	5.6
<i>Penicillium</i>	318	7.7
<i>Trichosporon</i>	358	8.6
<i>Exophiala</i>	394	9.4
<i>Epiccocum</i>	407	9.7
<i>Aureobasidium</i>	407	9.7
<i>Candida</i>	551	13.1
<i>Saccharomyces</i>	557	13.3
TOTAL	4,179	100

A diferencia de lo reportado en Australia en zonas boscosas, en ninguno de los árboles analizados en este estudio, se aisló *C. gattii*. Lo anterior puede deberse a que la Ciudad Universitaria es una zona altamente perturbada, debido a las modificaciones urbanas del lugar. Es importante continuar con la búsqueda de la fuente ambiental natural de *C. gattii* debido a que continúa el reporte de casos de criptococosis, causados por esta especie, en nuestra ciudad [3, 17].

Los siete aislamientos de *C. albidus*, presentaron: cápsula, pigmentos melánicos y termotolerancia a 37°C, características que en *C. neoformans* se han comprobado como factores de virulencia y que se desconocían en *C. albidus* [12, 25] que había sido considerado como inocuo. Asimismo se ha demostrado que algunas cepas de *C. albidus* aisladas de la naturaleza, presentan mayor resistencia a los antifúngicos, que las aisladas de casos clínicos [9]. Estas características de patogenicidad están estrechamente

Tabla 2. Datos promedio de algunos factores ambientales prevalentes en los días de la colecta

Meses	Temperatura máxima (°C)	Temperatura mínima (°C)	Precipitación pluvial (mm)
Abril	28.0	12.5	0.4
Julio	28.6	11.9	6.6
Octubre	22.9	7.1	0.03
Enero	24.4	2.8	0

asociadas a la dinámica de infección, por lo que resulta interesante considerar a los árboles de eucalipto como fuentes potenciales de infección.

Por otra parte se ha demostrado que *C. albidus* es causante de la neumonitis alérgica del verano [19], al igual que muchos otros de los hongos identificados en los materiales vegetales, por lo anterior podría deducirse que los árboles de eucalipto fungen como fuentes importantes de alérgenos fúngicos.

En nuestro país, la criptococosis sigue ocupando un lugar importante como causa de morbilidad y mortalidad, sobre todo en pacientes con SIDA, por lo que siguen siendo prioritarios los estudios para describir nuevos hábitats de las especies de *Cryptococcus* y por consiguiente las fuentes de infección potenciales de esta levadura.

Agradecimientos

Al Maestro Antonio Camacho del Centro Meteorológico Universitario de la Facultad de Filosofía y Letras de la UNAM por su ayuda en la medición de los datos climatológicos; al actuario Jaime García Romero del Programa Universitario de Investigación en Salud, UNAM, por su asesoría en la selección, por números aleatorios, de una muestra representativa de los eucaliptos de Ciudad Universitaria. Este trabajo fue realizado con financiamiento de la Dirección General de Apoyo al Personal Académico, UNAM, bajo el convenio PAPIIT IN-215997.

Literatura citada

- Barnett, J.A., R.W. Payne, D. Yarrow, 2000. Yeasts: characteristics and identification. Cambridge University Press, Cambridge.
- Callejas, A., N. Ordóñez, M.C. Rodríguez, E. Castañeda, 1998. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotype C, from the environment in Colombia. *Medical Mycology* 36:341-344.
- Castañón-Olivares, L.R., R. Arreguín-Espinosa, G. Ruiz-Palacios y Santos, R. López-Martínez, 2000. Frequency of *Cryptococcus* species and varieties in México and their comparison with some Latin-american countries. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 42:35-40.
- De Azeredo, L.A., E.A. Gomes, L.C. Mendonca-Hagler, A.N. Hagler, 1998. Yeast communities associated with sugarcane in Campos, Rio de Janeiro, Brazil. *International Microbiology* 1:205-208.
- De Castro, L.E., O.A. Sarraf, J.M. Lally, H.P. Sandoval, K.D. Solomon, D.T. Vroman, 2005. *Cryptococcus albidus* keratitis after corneal transplantation. *Cornea* 24:882-883.
- Duarte A., N. Ordóñez, E. Castañeda, 1994. Association of yeast of the *Cryptococcus* genus with *Eucalyptus* species in Santafé de Bogotá. *Revista del Instituto de Medicina Tropical São Paulo* 36:125-130.
- Ellis, D.H., T.J. Pfeiffer, 1990. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Journal of Clinical Microbiology* 28:1642-1644.
- Fonseca, A., G. Scorzetti, J.W. Fell, 2000. Diversity in the yeast *Cryptococcus albidus* and related species as revealed by ribosomal DNA sequence analysis. *Canadian Journal of Microbiology* 46:7-27.
- García-Martos, P., J.F. Noval, A. García-Tapia, P. Marin, J.L. Puerto, A. Sepulveda, 2002. Susceptibility to antifungal agents of *Cryptococcus* species of clinical interest. *Medicina Clínica* 119:211-213.
- Gueho, E., L. Improvisi, R. Christen, G.S. De Hoog, 1993. Phylogenetic relationships of *Cryptococcus neoformans* and some related basidiomycetous yeast determined from partial large subunit rRNA sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* 63:175.
- Hamasha, A.M., S.T. Yildira, A. Gonlum, M.A. Saracli, L. Doganci, 2004. *Cryptococcus neoformans* varieties from material under the canopies of eucalyptus trees and pigeon dropping samples from four major cities in Jordan. *Mycopathologia* 158:195-199.
- Ikeda, R., T. Sugita, E.S. Jacobson, T. Shinoda, 2002. Laccase and melanization in clinically important *Cryptococcus* species other than *Cryptococcus neoformans*. *Journal Clinical of Microbiology* 40:1214-1218.
- Inacio, J., P. Pereira, M. de Carvalho, A. Fonseca, M.T. Amaral-Collaco, I. Spencer-Martins, 2002. Estimation and diversity of phylloplane mycobiota on selected plants in a Mediterranean-type ecosystem in Portugal. *Microbial Ecology* 44:344-353.
- Kielstein, P., H. Hotzel, A. Schmalreck, D. Khaschabi, W. Glawischnig, 2000. Occurrence of *Cryptococcus* spp., in excreta of pigeons and pet birds. *Mycoses* 43:7-15.
- Lazera, M., M. Cavalcanti, L. Trilles, M. Nishikawa, B. Wanke, 1998. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. *Medical Mycology* 36:112-119.
- Libkind, D., P. Perez, R. Sommaruga, M.C. Dieguez, M. Ferraro, S. Brizzio, H. Zagarese, M. Van Broock, 2004. Constitutive and UV-inducible synthesis of photoprotective compounds (carotenoids and mycosporines) by freshwater yeasts. *Photochemical Photobiological Sciences* 3:281-286.
- López-Martínez, R., J.L. Soto-Hernández, L. Ostrosky-Zeichner, L.R. Castañón-Olivares, V. Angeles-Morales, J. Sotelo, 1996. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* among patients with cryptococcal meningitis in Mexico. First observations. *Mycopathologia* 134:61-64.
- McCurdy, L.H., J.D. Morrow, 2001. Ventriculitis due to *Cryptococcus uniguttulatus*. *Southern Medical Journal* 94:65-66.
- Miyagawa, T., S. Hamagami, N. Tanigawa, 2000. *Cryptococcus albidus*-induced summer-type hypersensitivity pneumonitis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 161:961-966.
- Rosario, I., M. Hermoso de Mendoza, S. Deniz, G. Soro, I. Alamo, B. Acosta, 2005. Isolation of *Cryptococcus* species including *C. neoformans* from cloaca of pigeons. *Mycoses* 48:421-424.
- Simon, G., G. Simon, M. Erdos, L. Marodi, 2005. Invasive *Cryptococcus laurentii* disease in a nine-year-old boy with X-linked hyperimmunoglobulin M syndrome. *Pediatric Infectious Disease Journal* 24:935-937.
- Slavikova, E., R. Vadkertiova, 2003. The diversity of yeasts in the agricultural soil. *Journal of Basic Microbiology* 43:430-436.
- Sorrell, T.C., D.H. Ellis, 1997. Ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Revista Iberoamericana de Micología*. 14:42-43.
- Staib, F., H. P. R. Seelinger, 1996. Un nouveau milieu sélectif pour l'isolement de *C. neoformans* des matieres fécales et du sol. *Annales de l'Institut Pasteur* 110: 792-793.
- Sugita, T., M. Takashima, R. Ikeda, T. Nakase, T. Shinoda, 2001. Intraspecies diversity of *Cryptococcus albidus* isolated from humans as revealed by sequences of the internal transcribed spacer regions. *Microbiology and Immunology* 45:291-297.
- Terrazas, T., M.E. Cortés, S. Segura, B. Torres, Y. Olalde, L. Villasana, J.V. Tapia, 1995. La vegetación urbana del *campus* universitario y la polémica del eucalipto. Programa de mejoramiento de las áreas verdes del *campus* universitario. Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F.
- Trindade, R.C., M.A. Resende, C.M. Silva, C.A. Rosa, 2002. Yeasts associated with fresh and frozen pulps of Brazilian tropical fruits. *Systematic and Applied Microbiology* 25:294-300.
- Vilcins, I., M. Krockenberger, H. Agus, D. Carter, 2002. Environmental sampling for *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from the Blue Mountains National Park, Sydney, Australia. *Medical Mycology* 40:53-60.